

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. März 2001 (15.03.2001)

PCT

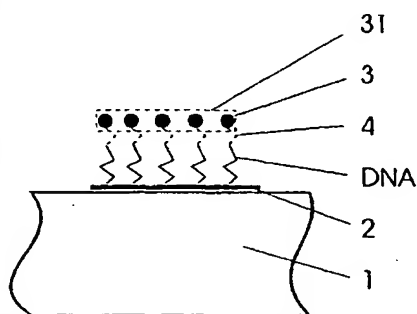
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/18242 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68, (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE HOCHTECHNOLOGIE E.V. [DE/DE]; Winzerlaer Strasse 10, 07745 Jena (DE).
GOIN 21/55, 33/543
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08360
- (22) Internationales Anmeldedatum: 28. August 2000 (28.08.2000) (71) Anmelder und (72) Erfinder: FRITZSCHE, Wolfgang [DE/DE]; Hufelandweg 16, 07743 Jena (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CZAKI, Andrea [DE/DE]; Georgstrasse 9, 07774 Camburg (DE). KÖHLER, Johann, Michael [DE/DE]; Untergasse 8, 07751
- (30) Angaben zur Priorität: 199 43 704.1 8. September 1999 (08.09.1999) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: AFFINITY SENSOR FOR THE DETECTION OF BIOLOGICAL AND/OR CHEMICAL SPECIES AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: AFFINITÄTSSENSOR ZUM NACHWEIS BIOLOGISCHER UND/ODER CHEMISCHER SPEZIES UND DESSEN VERWENDUNG



(57) Abstract: The invention relates to an affinity sensor for the detection of biological and/or chemical species which enables rapid, quantitative and simple detection of the presence of biological and/or chemical species in particular on surfaces in the lower to middle micrometer range. The sensor, depending on the embodiment, consists of an optically transparent or a partially reflecting substrate (1) which is provided with several, voneinander beabstandeten microstructured binding surfaces (2), whose surface compared to the diameter of the nanoparticles (3) and above the light optical refractive limit is chosen to be of such a size that said nanoparticles (3), which are provided with coupling partners (4), which have a selective affinity to the binding surfaces (2) or (DNA) sequences specifically bound thereto such that they can bind durably to the binding surfaces (2) or specifically bound to the said sequences (DNA), daß auf one or more binding surfaces (2) eine so large number of nanoparticles (3) unter Ausbildung von nanoparticle occupation (31) anbindbar can be connected, daß die von der nanoparticle covarge (31) covered surface relative to the surface Fläche einer Bindefläche (2) can comprise at least 0.1 %, whereby all binding surfaces together (2) zusammen in such active surfaces are arranged, such that they together with the object of a standard optical light microscope with a numerical mit aperature between 0.1 . and 0.9, for determining the nanoparticle occupation (31) generated optical absorption, reflection or scattering or by a device for the determination of plasmonen resonances.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Affinitätssensor zum Nachweis biologischer und/oder chemischer Spezies, welcher eine schnelle, quantitative und aufwandsgeringe Detektion der Anwesenheit von biologischen und/oder chemischen Spezies, insbesondere auf Flächen im unteren bis mittleren Mikrometerbereich, ermöglicht. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß der Sensor je nach Ausleseart aus einem optisch transparenten oder teilreflektierenden Substrat (1) besteht, das mit mehreren, voneinander beabstandeten mikrostrukturierten Bindeflächen (2) versehen ist, deren Fläche in Relation zum Durchmesser von Nanopartikeln (3) und oberhalb des lichtoptischen Beugungslimits so groß festgelegt ist, daß die Nanopartikel (3), die mit Kopplungspartnern (4) versehen sind, welche zu den Bindeflächen (2) oder darauf spezifisch gebundener Sequenzen (DNA) eine solche selektive Affinität aufweisen, daß sie eine anhaltende Bindung mit den Bindeflächen (2) oder darauf spezifisch gebundener Sequenzen (DNA) derart eingehen, daß auf einer oder mehreren Bindeflächen (2) eine so große Anzahl von Nanopartikeln (3) unter Ausbildung von Nanopartikelbelegungen (31) anbindbar sind, daß die von der Nanopartikelbelegung (31) eingenommene Fläche bezogen auf die Fläche einer Bindefläche (2) mindestens 0,1 % betragen kann, wobei alle Bindeflächen (2) zusammen in einem solchen aktiven Flächenbereich angeordnet sind, daß sie gemeinsam von einem Objektiv eines üblichen lichtoptischen Mikroskops mit einer numerischen Apertur zwischen 0,1 ... 0,9, zwecks Bestimmung der durch die Nanopartikelbelegungen (31) erzeugten optischen Absorption, Reflexion oder Streuung oder durch eine Vorrichtung zur Bestimmung der Plasmonenresonanz erfassbar sind.

WO 01/18242 A1

BEST AVAILABLE COPY



Golmsdorf (DE). REICHERT, Jörg [DE/DE]; Kastanienstrasse 4, 07747 Jena (DE).

(74) **Anwalt:** PFEIFFER, Rolf-Gerd; Pfeiffer & Partner, Winzerlaer Strasse 10, 07745 Jena (DE).

(81) **Bestimmungsstaat (national):** US.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Affinitätssensor zum Nachweis biologischer und/oder chemischer Spezies und dessen Verwendung

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft einen Affinitätssensor zum Nachweis biologischer und/oder chemischer Spezies, der insbesondere für Aufgaben der kombinatorischen Chemie, für diagnostische Aufgaben, wie etwa in der Medizin oder zur Entwicklung neuer Wirkstoffe, z.B. für Medikamente
10 oder selektiv wirkende Pflanzenschutzmittel, Verwendung finden soll.

15

Zur Identifikation biologischer Spezies, Individuen und Krankheiten haben sich Nachweise durch Molekül-Molekül-Wechselwirkung als besonders zweckmäßig erwiesen. Die Messung von Bindungsereignissen auf Biochips erfolgt dabei in der Regel unter Verwendung von
15 Fluoreszenzmarkern. Diese Methode besitzt jedoch mehrere wesentliche Nachteile:

20

- für die Auslesung sind sehr empfindliche Detektoranordnungen erforderlich, die zudem Anregungs- und Fluoreszenzlicht streng voneinander trennen müssen,

25

- die Quantifizierung ist problematisch, da die Quantenausbeuten der Fluoreszenz sehr stark umgebungsabhängig sind (Tanke, H.J.; Herman B. Fluorescence Microscopy, Springer Verlag (1998)). Deshalb sind quantitative analytische Aussagen oft gar nicht oder nur mit einem sehr hohen Meßaufwand erreichbar (Rost FWD Quantitative Fluorescence
25 Microscopy, Cambridge University Press. (1991), so daß beispielsweise eine Auswertung nur unter Einbeziehung von Messungen an mehreren Chips möglich wird (Hacia, J.G.; Brody, L.C.; Chee, M.S., Fodor, S.C.;
30 Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two colour fluorescence analysis, Nature Genetics 14, 441-447 (1996)). Häufig scheitert jedoch selbst ein qualitativer Nachweis.

35

Die Detektion von Bindungsereignissen insbesondere auf hochintegrierten Biochips mit kleinen Bindeflächen durch Fluoreszenzmessung ist zeitaufwendig und nur mit teuren optischen

Einrichtungen für die Auslesung zu bewerkstelligen. Die für quantitative Messungen erforderlichen längeren Expositions- und Akkumulationszeiten bewirken zudem eine photochemische Degradation der Farbstoffe, die das Signal im Verlauf der Messung verschlechtert und die Quantifizierung erschwert. Die Intensität des Fluoreszenzlichtes pro Anregungslichtmenge und Bindeereignis hängt zudem von der spezifischen chemischen Umgebung der zum Markieren verwendeten Chromophore ab. Deshalb treten von Charge zu Charge und von Test zu Test und sogar innerhalb einer Probe erhebliche Abweichungen in den Meßsignalen auf, die die eigentlich erforderliche Quantifizierung der Meßsignale ganz erheblich beeinträchtigen. Ein langsamer photo- und thermochemischer Abbau der Chromophoren führt überdies dazu, daß Meßproben nicht über eine längere Zeiten lagerfähig sind, d.h. sie können nicht archiviert und etwa zu einem späteren Zeitpunkt für Vergleichsmessungen herangezogen werden.

Bei der Auslesung von Bindeereignissen auf Biochips besteht zusätzlich das Problem, daß für Assays bei einer ausreichend großen Zahl von diskreten mikrostrukturierten Bindeflächen (typischerweise ca. 100 - 1000 Bindeflächen) oder für SBH-Chips (typischerweise 10000 - 10^6 Bindeflächen) die Gesamtfläche aller einzelnen Bindeflächen auf einem Chip nicht zu groß sein darf, um bei der Inkubation mit einer Testlösung nicht zu große Zeiten für die diffusive Ausbreitung von Konzentrationsfronten bzw. die spontane Einstellung von Anlagerungs- und Desorptionsgleichgewichten mit den gekoppelten molekularen Transportschritten zu benötigen.

Kleine Gesamtflächen wären auch für eine parallele optische Auslesung von Vorteil, um nicht mit zu großen Objektivdurchmessern für die Ausleseoptiken arbeiten zu müssen, die die Methode verteuern. Durch eine Verminderung der Gesamtfläche reduziert sich bei Fluoreszenzfarbstoffmarkierung bei gleicher Dichte bindender Gruppen die absolute Zahl der Fluorophoren, was die ohnehin komplizierte Fluoreszenzmessung bei kleinen Stoffmengen auf Festkörperoberflächen weiter erschwert. Deshalb kann bei den etablierten Fluoreszenzverfahren die Auflösungsgrenze der optischen Abbildung (ca. 0.4 ... 1 μm) bei weitem nicht ausgeschöpft werden. Statt dessen wird überwiegend mit

Einzelflächen von 100 µm und mehr gearbeitet (Chee, M. et al.; Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays, Science 274 (1996), 610-614). Bei dieser Flächengröße erreicht man (für gleich große Zwischenräume) schon bei 100 Bindeflächen einen Flächenbedarf von 4 mm², was für schnelle Assays wegen der erforderlichen Diffusionszeiten schon erheblich zu hoch ist. Bei 10⁶ Bindeflächen würde die benötigte Gesamtfläche ca. 200 mm · 200 mm betragen, was weit oberhalb sinnvoller Dimensionen ist, wenn Biochips serienmäßig eingesetzt und ausgewertet werden sollen.

In US-PS 5,556,756 wird ein Gold-Sol beschrieben, das in analytischen Testkits eingesetzt werden kann. Da die Analytik auf einer Farbänderung der Oberfläche beruht, werden dabei vorzugsweise Partikel zwischen 1 nm und 5 nm eingesetzt. Das dort beschriebene Verfahren hat den Nachteil, daß zum einen relativ große Testflächen benutzt werden müssen und zum anderen permeable Membranen eingesetzt werden müssen, um Spülprozesse durchführen zu können. Diese Lösung ist nicht zur Markierung kleiner Bindeflächen im mittleren und unteren Mikrometerbereich geeignet.

Weiterhin ist es grundsätzlich bekannt, daß funktionalisierte Nanopartikel spezifisch an Biomoleküle angelagert werden können (Nicholl, D., Genetische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1995), S.24-27). Solche Bindeereignisse werden u.a. genutzt, um in der Grundlagenforschung mit Hilfe ultramikroskopischer Techniken wie z.B. Tunnel-, Kraft- und Transmissionselektronenmikroskopie sequenzspezifische Informationen auf der Skala von wenigen bis 1 nm aus auf Festkörperoberflächen immobilisierten biogenen Makromolekülen zu gewinnen. Dabei wird der Umstand genutzt, daß einzelne Partikel an diskrete Regionen eines einzelnen großen Moleküls angelagert werden. Zum Nachweis dieser einzelnen Partikel sind ultramikroskopische Verfahren unerlässlich. Diese sind aber zu aufwendig, d.h. sowohl in der Investition als auch in der Handhabung zu kompliziert und zu teuer, um für Serien- oder Routineanalysen eingesetzt zu werden.

Darüber hinaus ist es bekannt, daß grundsätzlich auch Submikrometerpartikel durch optische Methoden detektiert werden können. In WO 98/57148 A1 werden eine Methode und eine Anordnung beschrieben, bei der die durch die Anlagerung von solch kleinen Partikeln auf einen dünnen Metallfilm verbundene Änderungen des Winkels der Oberflächenplasmonen-resonanz festgestellt werden kann. Dieses Verfahren setzt eine aufwendige SPR-Anordnung voraus und ist außerdem auf die Existenz einer, den Lichtdurchtritt hindernden Metallschicht auf einem ansonsten transparenten Substrat angewiesen.

Es besteht ein dringender Bedarf an Affinitätssensoren zum Nachweis biologischer und/oder chemischer Spezies, die vorstehend genannte Nachteile vermeiden und die für Serien- oder Routineanalysen einsetzbar sind.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Affinitätssensor anzugeben, welcher eine schnelle, quantitative und aufwandsgeringe Detektion der Anwesenheit von biologischen und/oder chemischen Spezies, insbesondere auf Flächen im unteren bis mittleren Mikrometerbereich, ermöglicht.

Die Aufgabe wird durch die Merkmale des ersten Patentanspruchs gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind durch die nachgeordneten Ansprüche erfaßt.

Ein zuverlässiger Nachweis von Bindeereignissen auf Flächen im unteren bis mittleren μm -Bereich gelingt im Rahmen der Erfindung durch die Erzeugung von Nanopartikel-Schichten, die durch Marker gebildet sind, deren Dichte insbesondere durch Absorptions- aber auch durch Reflexions- oder Streulichtmessungen oder durch Plasmonenresonanzmessungen quantifizierbar ist. Bei sehr kleinen, elektrisch leitfähigen Nanopartikeln kann vorteilhaft die größenspezifische Absorption von Licht herangezogen werden, wodurch unter Einsatz von mehreren monodispersen Gruppen von Nanopartikeln mit unterschiedlichem Durchmesser auch Mehrfachmarkierungen möglich sind. Die selektive Markierung von immobilisierten Biomolekülen hat sich als überraschend

unproblematisch erwiesen. Als besonders günstig haben sich Goldpartikel zur Markierung herausgestellt. Bei dem Einsatz von Goldpartikeln ist ein solcher Affinitätssensor auch in einer Vorrichtung zur Bestimmung der Plasmonenresonanz einbindbar. Eine selektive Bindung ist auch bei
5 relativ großen Partikeldurchmessern nachzuweisen, die bereits recht komfortable Streulichtsignale liefern.

Besonders vorteilhaft kann durch die bei vorliegender Erfindung vorgesehene flächenhafte Markierung mit insbesondere metallischen
10 Nanopartikeln die Auslesung von Bindeereignissen auf Biochips erfolgen.

Die Erfindung soll nachstehend anhand schematischer Ausführungsbeispiele näher erläutert werden. Es zeigen:

15 Fig. 1 schematisch in Draufsicht einen Affinitätssensor,

Fig. 2 einen Teilbereich des Affinitätssensors nach Fig. 1 in seitlicher Ansicht,

Fig. 3 eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer Nanopartikel-
20 Schicht, die durch eine Belegung mit 30 nm Goldpartikeln gebildet ist und

Fig. 4 eine lichtmikroskopische Durchlichtaufnahme einer einzelnen Bindefläche nach Fig. 3, die die durch die Nanopartikel-
25 Schicht bewirkte Absorption gegenüber dem sie tragenden Substrat veranschaulicht.

Figur 1 zeigt beispielhaft einen Affinitätssensor zum Nachweis biologischer und/oder chemischer Spezies bestehend aus einem optisch transparenten Substrat 1, das mit mehreren, voneinander beabstandeten
30 mikrostrukturierten Bindeflächen 2 versehen ist. Die Art und Ausbildung der Bindeflächen erfolgt je nach Vorgabe der zu ermittelnden Bindeereignisse und ist als solche durch übliches fachgemäßes Handeln realisierbar, weshalb hier dazu keine weiteren Ausführungen erforderlich sind. Die Beabstandung der Bindeflächen 2 erfolgt im Beispiel durch
35 freistrukturierte Bereiche 11 des Substrats 1. Die Bemaßung der Seitenlängen der einzelnen hier quadratisch ausgeführten Bindeflächen 2

erfolgt derart, daß sie oberhalb des lichtoptischen Beugungslimits festgelegt ist; im Beispiel $2\text{ }\mu\text{m}$, jedenfalls $\geq 0,5\text{ }\mu\text{m}$. Die Seitenlänge des optisch transparenten Substrats 1 soll im Beispiel 3 mm betragen, wobei der aktive Flächenbereich 22, nämlich die Fläche des Substrats 1, die mit den Bindeflächen 2 versehen ist, lediglich in der Größenordnung von 1 mm^2 festgelegt ist, für bestimmte Anwendungen (z.B. eine schnelle Diagnostik) auch Flächen unterhalb $0,01\text{ mm}^2$ problemlos einnehmen kann, wesentlich ist lediglich, daß den einzelnen Bindeflächen 2 eine Fläche gegeben ist, die oberhalb des lichtoptischen Beugungslimits liegt, wobei der durch alle Bindeflächen 2 eingenommene aktive Flächenbereich 22 von gängigen Objektiven mit einer numerischen Apertur zwischen $0,1 \dots 0,9$, vorzugsweise $0,2$, lichtoptischer Mikroskope erfaßbar sein soll. Verzichtet man auf diesen durch die Erfindung geschaffenen Vorteil, ist es ebenso möglich teure Objektive mit einer größeren Apertur einzusetzen, wobei dann auch größere aktive Flächenbereiche 22 zum Einsatz gelangen können.

Figur 2 zeigt einen Teilbereich des Affinitätssensors nach Fig. 1 in seitlicher Ansicht, wobei gleiche Teile mit gleichen Bezugszeichen wie in Fig. 1 bezeichnet sind. Die im Rahmen der Erfindung eingesetzten Nanopartikel 3 sind mit Kopplungspartnern 4 versehen, welche zu den Bindeflächen 2 oder, wie im Beispiel nach Fig. 2 dargestellt, darauf spezifisch gebundener Sequenzen (DNA) eine hohe selektive Affinität aufweisen. Zur näheren Erläuterung soll folgendes Beispiel dienen:

Oligonukleotide mit bspw. 20 Basenpaaren sind auf den mikrostrukturierten Bereichen des Substrats 1 immobilisiert und bilden so die vorstehend bezeichneten Bindeflächen 2. Der so präparierte Affinitätssensor wird mit einer zu testenden Lösung versetzt, die DNA unbekannter Zusammensetzung enthält. Diese bindet nur auf den Bindeflächen 2, die zu Teilabschnitten der DNA komplementäre Oligonukleotide tragen. Nach dem Abspülen, zwecks Entfernung unspezifisch gebundener DNA, wird die Substratoberfläche einer kolloidalen Lösung der Nanopartikel, im Beispiel bestehend aus Gold mit einem Partikeldurchmesser von 30 nm , ausgesetzt. Die Oberfläche der Nanopartikel ist mit einem Kopplungspartner 4 versehen,

im Beispiel einem Oligonukleotid, dessen Sequenz so beschaffen ist, daß es nicht komplementär zu einem der Bindeflächen 2 auf dem Substrat 1 aber komplementär zu einer konservativen Nukleotidabfolge der zu untersuchenden Targetmoleküle ist, die in allen in Frage kommenden Targetmolekülen (gebundene DNA) gleich vorkommt. Der nach einer Hybridisierung erhaltene Zustand des Affinitätssensors ist im Teilausschnitt in Fig. 2 veranschaulicht.

Nach der Hybridisierung ist im Beispiel eine Dichte von ca. 40 Partikeln/ μm^2 erhalten worden, wobei im Beispiel den eingesetzten Goldnanopartikeln 3 ein Durchmesser von 30 nm gegeben ist. Bei einer Querschnittsfläche der einzelnen Nanopartikel von ca. 700 nm^2 erhält man Nanopartikel-Schichten mit einer Nanopartikelbelegung 31 von ca. 3%, welche im Lichtmikroskop sofort und deutlich sichtbar sind. Diese Strukturen entsprechen den vorstrukturierten Bindeflächen 2.

Die Durchmesserbereiche der Nanopartikel 3 sind in Abhängigkeit vom jeweils auszubildenden Testassay in weiten Grenzen festlegbar. So können die Durchmesser der Nanopartikel in der Größenordnung von 2 ... 600 nm festgelegt sein. Vorzugsweise ist je nach dem für die Nanopartikel ausgewähltem Material ein Durchmesserbereich von 15 ... 60 nm gewählt. Bevorzugt kommen im Rahmen der Erfindung metallische Nanopartikel zum Einsatz, da sie in sehr effektiver Weise Licht absorbieren, wodurch schon Nanopartikelbelegungen in der Größenordnung von 0,1% im Lichtmikroskop im Durchlicht detektierbar sind. Damit ist es möglich, auch bei Ausdehnungen der einzelnen Bindeflächen 2 knapp oberhalb der Beugungsgrenze ($1 \mu\text{m} \dots 10 \mu\text{m}$) zu arbeiten. 100 Bindeflächen 2 lassen sich auf diese Weise auf aktiven Flächen 22 von deutlich weniger als 0.1 mm Seitenlänge plazieren, 10000 Bindeflächen 2 auf weniger als 1 mm^2 . Selbst für höchstintegrierte Affinitätssensoren mit 100000 Bindeflächen 2 erscheint eine Gesamtfläche von weniger als 1 mm^2 gut realisierbar. Auf diese Weise sind sehr schnell arbeitende und für kleinste Probenmengen geeignete Assays aufbaubar, so daß für niederintegrierte Assays lediglich Probenmengen bis unter 1 nl und für höher integrierte bis zu ca. 1 μl benötigt werden.

Es liegt im Rahmen der Erfindung, für die vorgesehenen Nanopartikel 3 auch metallhaltige Kompositpartikel im genannten Größenbereich als

auch Nanopartikel aus einem Halbleitermaterial, wie z.B. CdSe, InP, als auch beschichtete Nanopartikel, bspw. mit ZnSe, einzusetzen. Auch liegt es im Rahmen der Erfindung, Nanopartikel aus Kunststoff einzusetzen, die bevorzugt Einschlüsse aus einem absorbierenden Farbstoff, Metall oder Halbleitern beinhalten.

Wesentlich bei der Auswahl genannter Nanopartikel 3 bzgl. ihrer materialmäßigen Zusammensetzung und Größe ist lediglich, daß die durch sie gebildeten Nanopartikelbelegungen 31 mit Objektiven üblicher lichtoptischer Mikroskope, zwecks Bestimmung der durch die Nanopartikelbelegung 31 hervorgerufenen optischen Absorption, Reflexion oder Streuung, auch bei den vorstehend beschriebenen niedrigen Dichten der Nanopartikel pro Bindefläche 2 bei Erfassung der gesamten aktiven Fläche 22 detektierbar sind. Ebenso kann die Anordnung der Bindeflächen 2, die genannte Nanopartikelbelegungen 31 aufnehmen, in vorstehend beschriebener Weise auf der Fläche eines Prismas vorgesehen sein, wodurch ein solcher Affinitätssensor einer Vorrichtung zur Erfassung der Plasmonenresonanz zugänglich ist.

Für die Auswahl der als Marker dienenden Nanopartikel 3 gilt, daß deren Größe so gewählt wird, daß sie einerseits auch bei wenigen bindenden Molekülen schon einen sehr effektiven Beitrag zur Signalentstehung leisten, wobei sie nicht zu klein sein dürfen, die andererseits aber, um spezifisch anzukoppeln, nicht zu groß sein dürfen, wobei durch die Ankopplung von mehreren Nanopartikeln 3 an einer einzelnen Bindefläche 2 ein kooperativer Meßeffect erreicht wird. Bei abnehmender Partikelgröße wird das Meßsignal schlechter, bei zunehmender Partikelgröße geht die Spezifität der Bindung zurück. Ersteres führt zu einer Verringerung des Absolutsignals, letzteres zu einer Anhebung des Hintergrundsignals. Die jeweils konkrete Auswahl der betreffenden Partikel liegt in einem für den Fachmann zumutbaren Rahmen. Für den vorstehend beschriebenen Einsatz. Im beschriebenen Beispiel wurden Au-Partikel mit einem Durchmesserbereich zwischen 15 nm und 60 nm als besonders bevorzugt gefunden.

Zur Verdeutlichung der erzielten Anbindungen zeigt Figur 3 eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer Nanopartikelbelegung 31 auf einem 5 · 5 µm großen Fläche, die durch eine Belegung mit 30 nm

Goldpartikeln gebildet ist, wobei in Figur 4 eine lichtmikroskopische Durchlichtaufnahme einer einzelnen Bindefläche, die die durch die Nanopartikelbelegung 31 bewirkte Absorption gegenüber dem sie tragenden Substrat 1 veranschaulicht.

5

Der vorgeschlagene Affinitätssensor bietet zusammengefaßt gegenüber der nach dem Stand der Technik üblichen Fluoreszenzfarbstoffmarkierung und -auslesung folgende Vorteile:

10

1. Eine einfache Handhabung des Affinitätssensors ist gewährleistet, da keine giftigen, cancerogenen und umweltschädlichen Farbstoffe zur Markierung zum Einsatz gelangen.

15

2. Es ist eine Unabhängigkeit des Signals von der chemischen Umgebung gegeben, weshalb der Affinitätssensor für quantitative Messungen verwendet werden kann.

20

3. Es erfolgen keine stofflichen Veränderungen (Ausbleichen o.ä.) während der Messung. Deshalb kann sogar bei einer scannenden Auslesung des aktiven Flächenbereichs 22 das ganze Assay beleuchtet bleiben, ohne daß Veränderungen in den Meßsignalen eintreten.

25

4. Kurze Inkubationszeiten sind gewährleistet, da selbst für eine hohe Anzahl einzelner Bindungsflächen der aktive Flächenbereich sehr klein festlegbar ist.

30

5. Durch den vorgeschlagenen Aufbau des Affinitätssensors ist ein günstiges Signal-Rausch-Verhältniss gegeben, wodurch kurze Meßzeiten realisierbar sind.

35

6. Durch die Möglichkeit der Ausbildung einer hohen Anzahl einzelner Bindeflächen auf einer sehr kleinen aktiven Fläche 22 ist die Auslesung mittels einfacher mikroskopischer Apparaturen gegeben, Im Gegensatz zum Stand der Technik sind keine Fluoreszenzoptiken und keine großen Objektive erforderlich.

7. Die Affinitätssensoren, die mit den Nanopartikelbelegungen versehen sind weisen eine langfristige Lagerstabilität auf, da die Partikelbelegungen von sich aus keinerlei Veränderungen erfahren, wodurch ihre Archivierung ermöglicht wird, was in der Medizin, insbesondere Gerichtsmedizin, der Umwelttechnik, der Prozeßkontrolltechnik und der Forschung neue Möglichkeiten eröffnet.

8. Durch die Quantifizierbarkeit und Lagerstabilität der Affinitätssensoren ist die Möglichkeit des Aufbaus von Kalibrier- oder sogar Eichnormalen gegeben.

5 Bedingt das mit vorliegender Erfindung realisierbare Größenverhältnis des aktiven Flächenbereichs 22 zu den einzelnen Bindeflächen 2 ist eine hohe Parallelität gewährleistet, so daß der vorgeschlagene Affinitätssensor auch für schnelle Assays und für kleine Probenmengen geeignet ist und bis zu etwa 10^6 Bindeflächen 22 auf einem
10 Flächenbereich von 1 mm^2 aufweisen kann, was vor allem für Tests mit Molekül-Bibliotheken-Chips, wie Biochips, DNA-Chips u.a. erheblich von Vorteil ist. Somit kann der vorgeschlagene Affinitätssensor insbesondere für Aufgaben der kombinatorischen Chemie, für diagnostische Aufgaben in der Medizin, zur Entwicklung neuer
15 Wirkstoffe, zur Entwicklung neuer Arzneiwirkstoffe oder zur Entwicklung selektiv wirkender Pflanzenschutzmittel Verwendung finden.

Alle in der Beschreibung, den nachfolgenden Ansprüchen und der Zeichnung dargestellten Merkmale können sowohl einzeln als auch in
20 beliebiger Kombination miteinander erfindungswesentlich sein.

Patentansprüche

1. Affinitätssensor zum Nachweis biologischer und/oder chemischer
5 Spezies bestehend aus einem, je nach Ausleseart optisch transparenten
oder teilreflektierenden Substrat (1), das mit mehreren, voneinander
beabstandeten mikrostrukturierten Bindeflächen (2) versehen ist, deren
Fläche in Relation zum Durchmesser von Nanopartikeln (3) und
10 oberhalb des lichtoptischen Beugungslimits so groß festgelegt ist, daß
die Nanopartikel (3), die mit Kopplungspartnern (4) versehen sind,
welche zu den Bindeflächen (2) oder darauf spezifisch gebundener
Sequenzen (DNA) eine solche selektive Affinität aufweisen, daß sie
eine anhaltende Bindung mit den Bindeflächen (2) oder darauf
15 spezifisch gebundener Sequenzen (DNA) derart eingehen, daß auf
einer oder mehreren Bindeflächen (2) eine so große Anzahl von
Nanopartikeln (3) unter Ausbildung von Nanopartikelbelegungen (31)
anbindbar sind, daß die von der Nanopartikelbelegung (31)
eingenommene Fläche bezogen auf die Fläche einer Bindefläche (2)
20 mindestens 0,1% betragen kann, wobei alle Bindeflächen (2)
zusammen in einem solchen aktiven Flächenbereich (22) angeordnet
sind, daß sie gemeinsam von
- einem Objektiv eines üblichen lichtoptischen Mikroskops mit einer
numerischen Apertur zwischen 0,1 ... 0,9, zwecks Bestimmung der
25 durch die Nanopartikelbelegungen (31) erzeugten optischen
Absorption, Reflexion oder Streuung oder
- durch eine Vorrichtung zur Bestimmung der Plasmonenresonanz
erfaßbar sind.
2. Affinitätssensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der
30 Durchmesser der zum Einsatz gelangenden Nanopartikel (3) in der
Größenordnung von 2 ... 600 nm festgelegt ist.
3. Affinitätssensor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der
35 Durchmesser der zum Einsatz gelangenden Nanopartikel (3)
vorzugsweise in der Größenordnung von 15 ... 60 nm festgelegt ist.

4. Affinitätssensor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Durchmesser der zum Einsatz gelangenden Nanopartikel (3) vorzugsweise in der Größenordnung von 2 ... 15 nm festgelegt ist.
- 5 5. Affinitätssensor nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß für die Nanopartikel (3) Metalle, insbesondere Gold, eingesetzt sind.
- 10 6. Affinitätssensor nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß für die Nanopartikel (3) metallhaltige Kompositpartikel eingesetzt sind.
- 15 7. Affinitätssensor nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß für die Nanopartikel (3) solche aus einem Halbleitermaterial, insbesondere CdSe, InP, eingesetzt sind.
- 20 8. Affinitätssensor nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß für die Nanopartikel (3) solche aus einem Kunststoff, die bevorzugt Einschlüsse aus einem absorbierenden Farbstoff, Metall oder Halbleitern beinhalten, eingesetzt sind.
- 25 9. Affinitätssensor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß Nanopartikel (3) mehrerer unterschiedlicher Größenklassen oder unterschiedlicher Zusammensetzung eingesetzt sind, die in verschiedenen Spektralbereichen auslesbar sind.
- 30 10. Affinitätssensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Bindeflächen (2) in der Größenordnung von $0,4 \mu\text{m}^2$ bis 1mm^2 festgelegt sind.
11. Affinitätssensor nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Bindeflächen (2) in der Größenordnung von $1 \mu\text{m}^2$ festgelegt sind.

12. Affinitätssensor nach Anspruch 1 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß bis zu 10^6 einzelne Bindeflächen in der Größenordnung von $1\ \mu\text{m}^2$ auf einem Flächenbereich (22) des transparenten Substrats in der Größenordnung von $1\ \text{mm}^2$ vorgesehen sind.

5

13. Verwendung eines Affinitätssensors nach den vorstehenden Ansprüchen für Aufgaben der kombinatorischen Chemie, für diagnostische Aufgaben in der Medizin, zur Entwicklung neuer Wirkstoffe, zur Entwicklung neuer Arzneiwirkstoffe oder zur

10

Entwicklung selektiv wirkender Pflanzenschutzmittel.

1 / 2

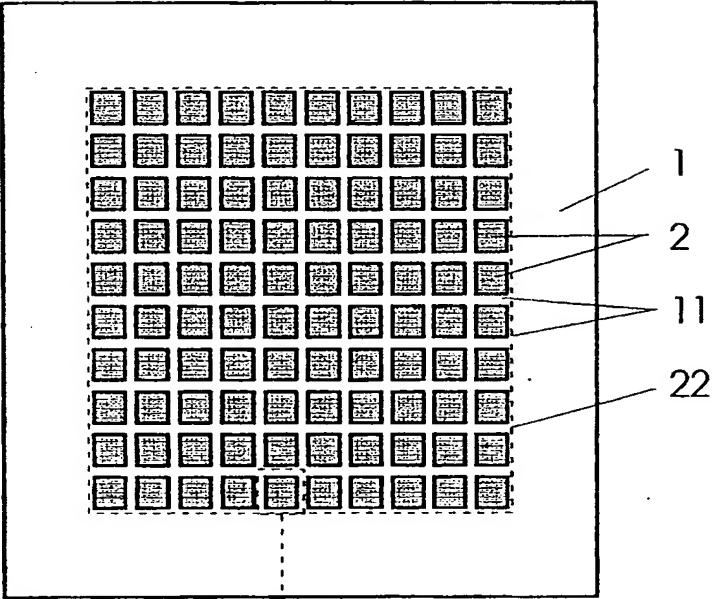


Fig. 1

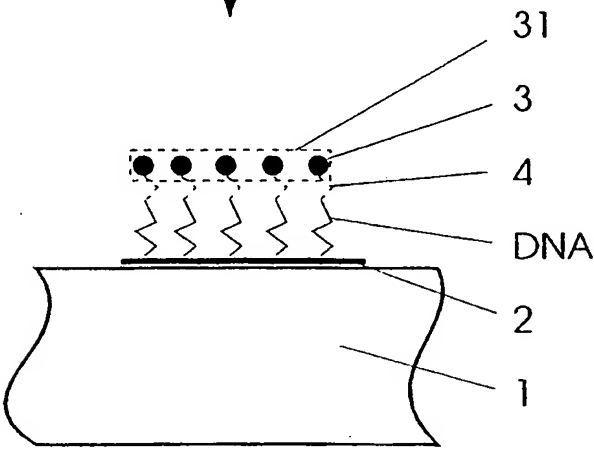


Fig. 2

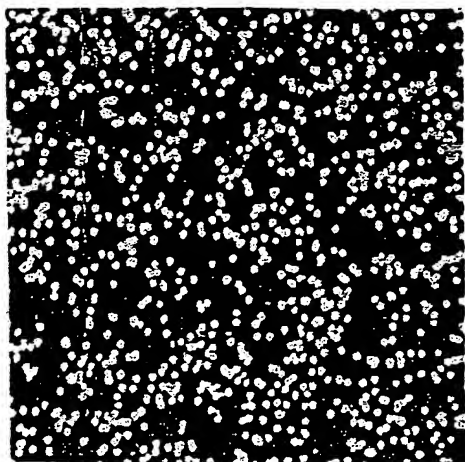


Fig. 3

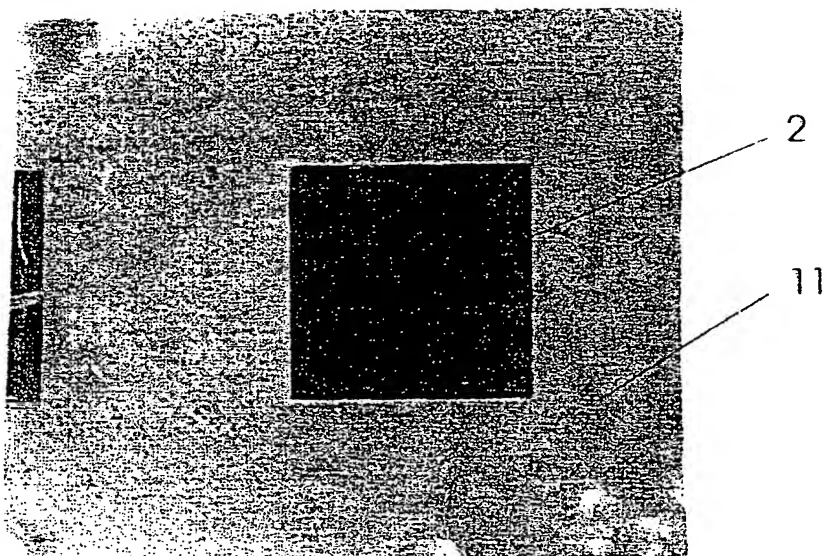


Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08360

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 G01N21/55 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 843 651 A (DONALD IRVINE STIMPSON ET AL.) 1 December 1998 (1998-12-01) abstract column 9, line 41 -column 10, line 5 column 14, line 15 - line 36 column 16, line 49 -column 17, line 45 figure 3; example 4	1-5,8, 10,13
X	EP 0 267 521 A (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 18 May 1988 (1988-05-18) abstract page 3, line 21 - line 31 figure 1; examples 1,3,5 --- -/--	1,2,5,13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 2001

Date of mailing of the international search report

06/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stevnsborg, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/08360

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 98 37417 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 27 August 1998 (1998-08-27) abstract page 5, line 22 -page 6, line 6 page 9, last paragraph page 19, line 11 - line 16 page 27, line 27 -page 28, line 16 claims 40,41,52; examples 1,5</p>	1-13
A	<p>WO 99 13319 A (AFFYMETRIX, INC.) 18 March 1999 (1999-03-18) the whole document</p>	1-13
A	<p>ANDREW J. THIEL ET AL. : "IN SITU SURFACE PLASMON RESONANCE IMAGING DETECTION OF DNA HYBRIDIZATION TO OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS ON GOLD SURFACES" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 69, no. 24, 15 December 1997 (1997-12-15), pages 4948-4956, XP000733394 columbus, us ISSN: 0003-2700 the whole document</p>	1-13
T	<p>T. ANDREW TATON ET AL.: "Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes" SCIENCE., vol. 289, 8 August 2000 (2000-08-08), pages 1757-1760, XP002158394 AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC., US ISSN: 0036-8075 the whole document</p>	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08360

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5843651	A	01-12-1998	US 5599668 A	04-02-1997
			AU 3636295 A	09-04-1996
			CA 2197321 A	28-03-1996
			EP 0783683 A	16-07-1997
			JP 10506190 T	16-06-1998
			WO 9609532 A	28-03-1996
<hr/>				
EP 267521	A	18-05-1988	AU 593151 B	01-02-1990
			AU 8063387 A	19-05-1988
			DK 590587 A	13-06-1988
			FI 874961 A	13-05-1988
			JP 63135861 A	08-06-1988
			NZ 222479 A	29-05-1989
			ZA 8708464 A	09-05-1988
<hr/>				
WO 9837417	A	27-08-1998	AU 6169098 A	09-09-1998
			EP 0979409 A	16-02-2000
<hr/>				
WO 9913319	A	18-03-1999	AU 9378898 A	29-03-1999
			EP 1012575 A	28-06-2000
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08360

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68 G01N21/55 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 843 651 A (DONALD IRVINE STIMPSON ET AL.) 1. Dezember 1998 (1998-12-01) Zusammenfassung Spalte 9, Zeile 41 - Spalte 10, Zeile 5 Spalte 14, Zeile 15 - Zeile 36 Spalte 16, Zeile 49 - Spalte 17, Zeile 45 Abbildung 3; Beispiel 4 ---	1-5,8, 10,13
X	EP 0 267 521 A (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 18. Mai 1988 (1988-05-18) Zusammenfassung Seite 3, Zeile 21 - Zeile 31 Abbildung 1; Beispiele 1,3,5 --- -/-	1,2,5,13

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Januar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stevnsborg, N

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08360

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WO 98 37417 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 27. August 1998 (1998-08-27) Zusammenfassung Seite 5, Zeile 22 -Seite 6, Zeile 6 Seite 9, letzter Absatz Seite 19, Zeile 11 - Zeile 16 Seite 27, Zeile 27 -Seite 28, Zeile 16 Ansprüche 40,41,52; Beispiele 1,5 ---</p>	1-13
A	<p>WO 99 13319 A (AFFYMETRIX, INC.) 18. März 1999 (1999-03-18) das ganze Dokument ---</p>	1-13
A	<p>ANDREW J. THIEL ET AL. : "IN SITU SURFACE PLASMON RESONANCE IMAGING DETECTION OF DNA HYBRIDIZATION TO OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS ON GOLD SURFACES" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 69, Nr. 24, 15. Dezember 1997 (1997-12-15), Seiten 4948-4956, XP000733394 columbus, us ISSN: 0003-2700 das ganze Dokument ---</p>	1-13
T	<p>T. ANDREW TATON ET AL.: "Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes" SCIENCE., Bd. 289, 8. August 2000 (2000-08-08), Seiten 1757-1760, XP002158394 AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC., US ISSN: 0036-8075 das ganze Dokument -----</p>	1-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08360

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5843651 A	01-12-1998	US 5599668 A AU 3636295 A CA 2197321 A EP 0783683 A JP 10506190 T WO 9609532 A	04-02-1997 09-04-1996 28-03-1996 16-07-1997 16-06-1998 28-03-1996
EP 267521 A	18-05-1988	AU 593151 B AU 8063387 A DK 590587 A FI 874961 A JP 63135861 A NZ 222479 A ZA 8708464 A	01-02-1990 19-05-1988 13-06-1988 13-05-1988 08-06-1988 29-05-1989 09-05-1988
WO 9837417 A	27-08-1998	AU 6169098 A EP 0979409 A	09-09-1998 16-02-2000
WO 9913319 A	18-03-1999	AU 9378898 A EP 1012575 A	29-03-1999 28-06-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.